

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-208640

(43)Date of publication of application : 29.07.2004

---

(51)Int.Cl.

C12N 9/00  
C12P 21/00  
// C12N 15/09

---

(21)Application number : 2003-001317

(71)Applicant : RENGO CO LTD

(22)Date of filing : 07.01.2003

(72)Inventor : SUZUKI TAKASHI  
EZURE TORU  
ITO MASAAKI

---

(54) EXTRACTED YEAST LIQUID FOR CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS, METHOD FOR PRODUCING THE SAME AND METHOD FOR CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for easily producing an extracted yeast liquid for cell-free protein synthesis giving increased quantity of synthesized protein, and provide the extracted yeast liquid and a method for the cell-free protein synthesis by using the extracted yeast liquid.

SOLUTION: The method for the production of the extracted yeast liquid for cell-free protein synthesis comprises the disintegration of yeast cells in frozen state to obtain the extracted liquid. The method for the cell-free protein synthesis uses the extracted yeast liquid.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 15.04.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**BEST AVAILABLE COPY**

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-208640

(P2004-208640A)

(43) 公開日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>  
**C 12N 9/00**  
**C 12P 21/00**  
// **C 12N 15/09**

F 1  
C 12N 9/00  
C 12P 21/00  
C 12N 15/09

テーマコード(参考)  
4 B 024  
4 B 050  
4 B 064

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2003-1317(P2003-1317)  
(22) 出願日 平成15年1月7日(2003.1.7)

(71) 出願人 000115980  
レンゴー株式会社  
大阪府大阪市福島区大開4丁目1番186  
号  
(74) 代理人 100080791  
弁理士 高島 一  
(72) 発明者 鈴木 崇  
大阪府大阪市福島区大開4-1-186  
レンゴー株式会社中央研究所内  
江連 徹  
大阪府大阪市福島区大開4-1-186  
レンゴー株式会社中央研究所内  
(72) 発明者 伊東 昌章  
大阪府大阪市福島区大開4-1-186  
レンゴー株式会社中央研究所内  
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】無細胞系タンパク質合成用酵母抽出液およびその調製方法、ならびにそれを用いた無細胞系タンパク質合成方法

## (57) 【要約】

【課題】調製が容易であり、かつ従来よりもタンパク質合成量の高い無細胞系タンパク質合成用酵母抽出液の調製方法、および該酵母抽出液、ならびにこの酵母抽出液を用いた無細胞系のタンパク質合成方法を提供する。

【解決手段】酵母菌体を凍結させた状態で破碎し、その抽出液を得る無細胞タンパク質合成用酵母抽出液の調製方法、および該酵母抽出液、ならびにこの酵母抽出液を用いた無細胞系のタンパク質合成方法。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

酵母菌体を凍結させた状態で破碎し、その抽出液を得る無細胞系タンパク質合成用酵母抽出液の調製方法。

**【請求項 2】**

酵母菌体を液体窒素によって凍結させるものである、請求項 1 に記載の調製方法。

**【請求項 3】**

酵母菌体の破碎が、乳鉢中で乳棒を用いてすり潰すことによって行われるものである、請求項 1 または 2 に記載の調製方法。

**【請求項 4】**

酵母菌体からの抽出後、分子量 5,000 以下の菌体内成分を除去して濃縮する、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の調製方法。

10

**【請求項 5】**

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法で調製された、無細胞系タンパク質合成用酵母抽出液。

**【請求項 6】**

請求項 5 に記載の酵母抽出液を含有する反応液を用いた無細胞系タンパク質合成方法。

**【請求項 7】**

反応液が pH 6.0 ~ 8.0 に調整されたものである、請求項 6 に記載の方法。

20

**【請求項 8】**

反応液を透析しながらタンパク質の合成反応を行うものである、請求項 6 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、無細胞系のタンパク質合成に使用できる酵母抽出液およびその調製方法、および当該抽出液を使用した無細胞系でのタンパク質合成方法に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

近年、ヒトゲノムを始め多くの生物の遺伝情報が解読されてきている。このような中、ポストゲノム研究として、これらの遺伝情報に対応するタンパク質の機能解析やゲノム創薬が注目を集めている。これらの遺伝情報に対応するタンパク質を医薬品などに応用、利用するには、莫大な種類のタンパク質を短時間で簡単に合成することが必要となってくる。

30

**【0003】**

現在、タンパク質の生産方法には、遺伝子組換え技術によって酵母や昆虫細胞などの生細胞を用いる発現系（以下、「細胞系」ということがある）が広く利用されている。しかし、生細胞は自己機能を維持するために外来タンパク質を排除する傾向があり、また生細胞で細胞毒タンパク質を発現すると細胞が生育しないなど発現が困難なタンパク質も多い。

**【0004】**

一方、細胞系を使用しないタンパク質の生産方法として、細胞破碎液や抽出液に基質や酵素などを加えるなどして生物の遺伝情報翻訳系を試験管内に取り揃え、目的のタンパク質をコードする mRNA を用いて、アミノ酸を望みの順番に必要な残基数結合させることのできる合成系を再構築する、無細胞系のタンパク質合成が知られている。このような無細胞系タンパク質合成では、上記細胞系のタンパク質合成のような制約を受けにくく、生物の命を断つことなくタンパク質の合成を行うことができ、またタンパク質の生産に培養などの操作を伴わないため細胞系と比較して短時間にタンパク質の合成を行うことができる。さらに無細胞系タンパク質合成では、生命体が利用していないアミノ酸配列からなるタンパク質の大量生産も可能となることから、有望な発現方法であると期待されている。このような無細胞系のタンパク質合成に供する細胞破碎液や抽出液として、種々の生物由來のものを使用することが検討され、研究が進められている。この中で、酵母は、大腸菌などの原核生物と同様に容易に培養することができるため、安価にその抽出液を得ることが

40

50

できる。また、酵母は真核生物であるため大腸菌などの抽出液では不可能な糖鎖付加などの翻訳後の修飾反応も行うことができる。このような観点より、酵母由来の無細胞系タンパク質合成用の抽出液の開発が注目されている。

#### 【0005】

酵母由来の抽出液を用いた無細胞系のタンパク質合成方法は、Gasi orらによって初めて報告された（たとえば、非特許文献1を参照。）。Gasi orらの方法では、まず、酵母を培養後、glucosidaseでスフェロプラストを調製した後、0.4M MgSO<sub>4</sub>を含むYM-5培地で再度培養を行う。次に、遠心分離で再度菌体を回収し、緩衝液で懸濁後、ダウンスホモジナイザーで細胞を破碎する。続いて、この破碎物を30,000×g、さらに100,000×gで遠心分離する。得られた上清をSephadex G-25に供してタンパク質含有量の高い画分を集め、これを無細胞系タンパク質合成用の抽出液としている。しかし、このようなGasi orらの方法は、抽出液の調製が非常に煩雑であり、多大な時間と労力を要するという問題があった。  
10

#### 【0006】

この問題を解決するため、Hussainらは、細胞破碎の方法を変えることで、より簡便な無細胞系タンパク質合成用の抽出液の作製方法を開発した（たとえば、非特許文献2を参照。）。Hussainらが提案した方法は、酵母を培養後、集菌して菌体を緩衝液で洗浄、懸濁後、ガラスピーズで細胞の破碎を行い、得られた破碎物を30,000×gで遠心分離し、得られた上清をSephadex G-25に供するという非常に簡便な抽出液の作製法であった。  
20

#### 【0007】

しかし、上記いずれの方法で得られた抽出液であっても、合成できるタンパク質の量は極めて少なく、放射能標識を行ったアミノ酸の取り込みによってのみ、そのタンパク質合成活性を測定できるという程度のものであった。このため、その調製が容易でありかつタンパク質合成量の高い酵母由来抽出液を調製する方法が望まれていた。

#### 【0008】

##### 【特許文献1】

特開2002-262867号公報

##### 【非特許文献1】

Gasi or, E. ら, J. Biol. Chem., 254, 3965-3969  
69, 1979  
30

##### 【非特許文献2】

Hussain, I ら, Gene, 46, 13-23, 1986.

#### 【0009】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記課題を解決するためになされたものであって、その目的とするところは、調製が容易であり、かつ従来よりもタンパク質合成量の高い無細胞系タンパク質合成用酵母抽出液の調製方法、および該酵母抽出液、ならびにこの酵母抽出液を用いた無細胞系のタンパク質合成方法を提供することである。

#### 【0010】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は以下のとおりである。

(1) 酵母菌体を凍結させた状態で破碎し、その抽出液を得る無細胞系タンパク質合成用酵母抽出液の調製方法。

(2) 酵母菌体を液体窒素によって凍結させるものである、上記(1)に記載の調製方法。

(3) 酵母菌体の破碎が、乳鉢中で乳棒を用いてすり潰すことによって行われるものである、上記(1)または(2)に記載の調製方法。

(4) 酵母菌体からの抽出後、分子量5,000以下の菌体内成分を除去して濃縮する、  
50

上記(1)～(3)のいずれかに記載の調製方法。

(5) 上記(1)～(4)のいずれかに記載の方法で調製された、無細胞系タンパク質合成用酵母抽出液。

(6) 上記(5)に記載の酵母抽出液を含有する反応液を用いた無細胞系タンパク質合成方法。

(7) 反応液がpH 6.0～8.0に調整されたものである、上記(6)に記載の方法。

(8) 反応液を透析しながらタンパク質の合成反応を行うものである、上記(6)に記載の方法。

#### 【0011】

本明細書における「無細胞系タンパク質合成」は、mRNAの情報を読み取ってタンパク質を合成する無細胞翻訳系によるタンパク質合成を指すものとする。ここで、本発明の合成方法によって無細胞系で合成される「タンパク質」は、複数のアミノ酸残基から構成される任意の分子量のペプチド、すなわち低分子量のペプチドから高分子量のいざれをも包含するものとする。また本明細書でいう「タンパク質」は、糖鎖修飾されてなる糖タンパク質も含む。10

#### 【0012】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、凍結させた酵母菌体を破碎して酵母菌体からの抽出を行うことによって、無細胞系タンパク質合成用の酵母抽出液を調製する方法である。このような方法によって酵母抽出液を調製することで、非特許文献1に記載の方法と比較して簡便であり、また非特許文献2に記載の方法より緩和な状態で細胞の破碎を行うことができる。20

#### 【0013】

本発明の調製方法では、酵母菌体を凍結させることを要する。酵母菌体は、液体窒素などの不活性ガスを用いて急激に凍結させることが望ましい。菌体を急激に凍結させなかつた場合には、タンパク質合成に必要な成分が失活などといった不具合を生じて本発明の上記効果を確実に達成できない虞があるためである。

上記酵母菌体の凍結は、たとえば、上記液体窒素を使用したり、アセトンードライアイスを使用したりすることで実現できるが、アセトンなどの有機溶媒を用いるとタンパク質合成に必要な成分が失活する虞があるため、液体窒素を用いて行うのが好ましい。30

#### 【0014】

上記のように酵母の菌体を凍結後、菌体が凍結した状態で細胞の破碎を行う。該酵母菌体の破碎は、凍結した酵母菌体が粉々になれば、いかなる方法を用いてもよい。たとえば、乳鉢中で乳棒を用いてすり潰す方法、メタルコーンを破碎媒体にマルチビーズショッカー（安井器械株式会社製）を用いて破碎する方法などが例示されるが、より緩和な条件での酵母菌体の破碎が可能であり、酵母菌体より無細胞系タンパク質合成に不要なものまで抽出してしまうことがないため、乳鉢中で乳棒を用いてすり潰す方法により酵母菌体を破碎することが好ましい。

#### 【0015】

なお本発明における「酵母」としては、酵母として従来より一般に認知されているものであれば、有胞子酵母、担子菌酵母、不完全酵母のいずれであっても特に制限なく使用することができる。中でも有胞子酵母を使用するのが好ましく、有胞子酵母の中でも分裂酵母を使用するのがさらに好ましく、分裂酵母の中でもSchizosaccharomyces pombeを使用するのが特に好ましい。40

本発明においては、単一種の酵母菌体から抽出を行ってもよいし、複数種の酵母菌体から抽出を行ってもよい。

#### 【0016】

本発明の方法において、破碎した酵母菌体からの抽出は、上記破碎後の酵母菌体に抽出用液を添加することによって行う。用いる抽出用液は、特に制限されるものではないが、プロテアーゼインヒビターを少なくとも含有するのが好ましい。プロテアーゼインヒビター50

を含有する抽出用液を用いると、酵母由来の抽出物に含有されるプロテアーゼの活性が阻害され、当該プロテアーゼによる抽出物中の活性タンパクの不所望な分解を防止でき、結果として酵母由来の抽出物が有するタンパク質合成能を有效地に引き出すことができるようになるという利点がある。

## 【0017】

上記プロテアーゼインヒビターとしては、プロテアーゼの活性を阻害し得るものであるならば特に制限はなく、たとえば、フェニルメタンスルホニルフルオリド（以下、「PMS F」ということがある。）、アプロチニン、ベスタチン、ロイペプチナ、ペプスタチンA、E-64 (*L-trans*-エボキシスクシニルロイシルアミド-4-グアニジノブタノン)、エチレンジアミン四酢酸、ホスホラミドなどを使用することができるが、酵母菌体内にはセリンプロテアーゼ活性が強いと推定されることから、セリンプロテアーゼに対して特異性の高いPMSFを使用するのが好ましい。また、一種類のプロテアーゼインヒビターのみならず、数種類の混合物（プロテアーゼインヒビターカクテル）を用いてもよい。

10

## 【0018】

当該抽出用液中におけるプロテアーゼインヒビターの含有量に特に制限はないが、本発明の作用に必須な酵素類の分解阻害能を好適に発揮できる観点から、 $1\text{ }\mu\text{M} \sim 50\text{ mM}$ 含有されることが好ましく、 $0.01\text{ mM} \sim 5\text{ mM}$ 含有されることがより好ましい。プロテアーゼインヒビターが $1\text{ }\mu\text{M}$ 未満であると、プロテアーゼの分解活性を充分抑えることができない傾向にあるためであり、またプロテアーゼインヒビターが $50\text{ mM}$ を越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

20

## 【0019】

また本発明に用いる抽出用液は、上記プロテアーゼインヒビターに加えて、カリウム塩、マグネシウム塩、ジチオトレイトルおよび緩衝剤を少なくとも含有するのが好ましい。

## 【0020】

上記カリウム塩としては、本発明の作用を阻害するようなものでなければ特に制限はなく、たとえば酢酸カリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、塩化カリウム、リン酸水素二カリウム、クエン酸水素二カリウム、硫酸カリウム、リン酸二水素カリウム、ヨウ化カリウム、フタル酸カリウムなど一般的な形態で使用することができ、中でも酢酸カリウムを使用するのが好ましい。カリウム塩は、タンパク質合成反応における補助因子として作用する。

30

## 【0021】

当該抽出用液中におけるカリウム塩の含有量に特に制限はないが、保存安定性の観点から、たとえば酢酸カリウムなど1価のカリウム塩である場合、 $1\text{ mM} \sim 500\text{ mM}$ 含有されることが好ましく、 $10\text{ mM} \sim 300\text{ mM}$ 含有されることがより好ましい。カリウム塩が $1\text{ mM}$ 未満または $500\text{ mM}$ を越えると、タンパク質合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

## 【0022】

上記マグネシウム塩としては、本発明の作用を阻害するようなものでなければ特に制限はなく、たとえば酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、クエン酸マグネシウム、リン酸水素マグネシウム、ヨウ化マグネシウム、乳酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、シュウ酸マグネシウムなど一般的な形態で使用することができ、中でも酢酸マグネシウムを使用するのが好ましい。マグネシウム塩も、タンパク質合成反応における補助因子として作用する。

40

## 【0023】

当該抽出用液中におけるマグネシウム塩の含有量に特に制限はないが、保存安定性の観点から、たとえば酢酸マグネシウムなど2価の塩である場合、 $0.01\text{ mM} \sim 10\text{ mM}$ 含有されることが好ましく、 $0.1\text{ mM} \sim 5\text{ mM}$ 含有されることがより好ましい。マグネシウム塩が $0.01\text{ mM}$ 未満または $10\text{ mM}$ を越えると、タンパク質の合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

50

## 【0024】

上記ジチオトレイトイール（以下、「DTT」ということがある。）は、酸化防止の目的で配合されるものであり、当該抽出用液中において0.01 mM～10 mM含有されることが好ましく、0.1 mM～5 mM含有されることがより好ましい。DTTが0.01 mM未満または10 mMを越えると、タンパク質の合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

## 【0025】

上記緩衝剤は、抽出用液に緩衝能を付与し、たとえば酸性または塩基性物質の添加などによって起こるpHの急激な変化による抽出物の変性を防止する目的で配合される。このような緩衝剤としては、特に制限はなく、たとえば、HEPES-KOH、Tris-HCl<sup>10</sup>、酢酸-酢酸ナトリウム、クエン酸-クエン酸ナトリウム、リン酸、ホウ酸、MES、PIPESなどを使用することができる。

緩衝剤は、当該抽出用液のpHが4～10に保持されるようなものを使用するのが好ましく、pHが6～8に保持されるようなものを使用するのがより好ましい。抽出用液のpHが4未満またはpHが10を越えると、本発明の反応に必須な成分が変性する虞があるためである。このような観点より、上記中でもHEPES-KOH(pH 6～8)を使用するのが特に好ましい。

## 【0026】

当該抽出液中における緩衝剤の含有量に特に制限はないが、好適な緩衝能を保持する観点から、5 mM～200 mM含有されることが好ましく、10 mM～100 mM含有されることがより好ましい。緩衝剤が5 mM未満であると、酸性または塩基性物質の添加によりpHの急激な変動を引き起こし、抽出物が変性する傾向にあるためであり、また緩衝剤が200 mMを越えると、塩濃度が高くなり過ぎ、タンパク質合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。<sup>20</sup>

## 【0027】

本発明の酵母抽出液の調製方法において、上記破碎後の酵母菌体からの抽出を行ってから無細胞系タンパク質合成用酵母抽出液を得るまでの手順等については特に制限されるものではないが、たとえば、以下の手順により行うことができる。

まず、上記破碎した酵母菌体に抽出用液を添加して得られた酵母抽出物を含有する液状物を、遠心分離にかける。当該遠心分離は、当分野において通常行われている条件(10,000×g～50,000×g, 0℃～10℃, 10分間～60分間)で行い上清を回収し、再度、上記の条件で行えばよい。<sup>30</sup>

遠心分離後、上清をゲル濾過する。ゲル濾過は、たとえば脱塩カラム P.D-10 (アマシャム バイオサイエンス社製) を好適に使用することができ、常法にしたがって、20%グリセロールを含む抽出用液にてカラムを平衡化した後、試料を供給し、上記抽出用液にて溶出する、というような条件にて行えばよい。上記ゲル濾過に用いる緩衝液としては、抽出用液にグリセロールを添加したものを用いるのが好ましい。これにより、タンパク質合成に必須な成分を安定化できるというような利点がある。グリセロールは、通常、5(v/v)%～40(v/v)%となるように添加すればよい。

ゲル濾過して得られる滤液は、通常のゲル濾過で行われているように、0.1 mL～1 mLを1画分とすればよく、高いタンパク質合成能を有する画分を効率よく分取するという観点より、0.4 mL～0.6 mLを1画分とするのが好ましい。

続いて、たとえばUltrospec 3300 pro (アマシャム バイオサイエンス社製)などの機器を用いて、280 nmにおける吸光度が20以上、260 nmにおける吸光度が30以上の画分をゲル濾過後の滤液より分取し、本発明の酵母抽出液とする。

## 【0028】

なお、本発明の調製方法に供する酵母菌体は、培地成分などによるタンパク質合成反応の阻害を防止するため、上記急激な凍結を行う前に、上述した好適な組成の抽出用液にて予め洗浄しておくのが好ましい。抽出用液での洗浄は、酵母菌体に抽出用液を添加し、これを遠心分離(たとえば、4℃、8,000×g、5分間という条件)することによって行<sup>40</sup><sup>50</sup>

う。

洗浄に用いる抽出用液の量は、培地を完全に洗い流すという理由から、湿重量 1 g の酵母菌体に対し 1 mL ~ 20 mL であるのが好ましく、2 mL ~ 15 mL であるのがより好ましい。

### 【0029】

また本発明の調製方法に供する酵母菌体の量は、特に制限されるものではない。

### 【0030】

本発明の方法にて調製された無細胞系タンパク質合成用の抽出液は、好適には、酵母由来の抽出物を、1 mg/mL ~ 200 mg/mL 含有することが好ましく、10 mg/mL ~ 100 mg/mL 含有することがより好ましい。酵母由来の抽出物の含有量が 1 mg/mL 未満であると、タンパク質合成に必要な成分の濃度が低くなるため、充分な合成量が得られない虞があるためであり、また、酵母由来の抽出物の含有量が 200 mg/mL を越えると、タンパク質合成反応を阻害する因子も多く抽出されているので、合成反応時間が著しく短くなる虞があるためである。

該抽出液中の酵母由来の抽出物のタンパク質含有量は、たとえば、BCA Protein Assay Kit (PIERCE 社製) を使用し測定することができる。反応試薬 2 mL に対してサンプルを 0.1 mL 加え、37 °C で 30 分間反応させ、562 nm における吸光度を測定するといった手順によって行う。コントロールとしては、通常、ウシ血清アルブミンを使用する。

### 【0031】

また抽出液中に含有される抽出物が酵母由来のものであるか否かは、たとえば、抽出液に含まれるリボソーム RNA の塩基配列を解析することによって判別することができる。

### 【0032】

本発明の抽出液は、酵母由来の抽出物をタンパク質濃度で 1 mg/mL ~ 200 mg/mL 含有するとともに、1 mM ~ 500 mM の酢酸カリウム、0.01 mM ~ 10 mM の酢酸マグネシウム、0.01 mM ~ 10 mM のDTT、1 μM ~ 50 mM のPMSF、5 mM ~ 200 mM のHEPES-KOH (pH 6 ~ 8) を含有するように実現されるのが好ましい。

### 【0033】

また、本発明の抽出液は、上記調製方法で得られた後、分子量 5,000 以下 (好適には分子量 10,000 以下) の菌体内成分を除去し、濃縮したものであることが好ましい。かかる濃縮を行うことで、タンパク質合成に不必要的成分を除去することができ、必要な成分が濃縮されることで、タンパク質合成の反応速度が向上される。

### 【0034】

上記濃縮の方法は、特に制限されず、従来公知の適宜の手法によって行えばよい。濃縮は、濃縮後の抽出液の 280 nm における吸光度が好ましくは 10 ~ 100、より好ましくは 20 ~ 80 となるようを行う。濃縮後の抽出液の上記吸光度が 10 未満であると、タンパク質合成速度が遅く、結果的に合成量が向上しない傾向にあるためであり、また、上記吸光度が 100 を越えると、合成速度は向上されるが、合成反応時間が極めて短縮されるため、この場合も結果として合成量が向上されないという傾向にあるためである。

抽出液の濃縮に用いる手段としては、特に制限されず、従来公知の種々のもの、たとえば、ultrafree-0.5 centrifugal filter & tube (排除分子量: 10,000, millipore 社製)などを用いることができる。

### 【0035】

本発明はまた、上記抽出液を用いた無細胞系のタンパク質合成方法を提供するものである。かかる合成反応においては、通常、上記抽出液に無細胞系でのタンパク質合成に要する添加物を添加した反応液として調製する。上記添加物に特に制限はなく、無細胞系のタンパク質合成の分野において従来より一般に使用されているものであれば特に制限はない。なお上記反応液は、本発明の抽出液が 10 (v/v) % ~ 90 (v/v) %、特には 20 (v/v) % ~ 80 (v/v) % 含有されるように調製されるのが好ましい。

10

20

30

40

50

すなわち、上記反応液の全体において、酵母菌体由来の抽出物の含有量が、 $0.1\text{ mg}/\text{mL} \sim 180\text{ mg}/\text{mL}$ となるように調製されるのが好ましく、 $2\text{ mg}/\text{mL} \sim 80\text{ mg}/\text{mL}$ となるように調製されるのがより好ましい。当該抽出物の含有量がタンパク質濃度で $0.1\text{ mg}/\text{mL}$ 未満または $180\text{ mg}/\text{mL}$ を越えると、目的タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるため好ましくない。

## 【0036】

なお、本発明の無細胞系タンパク質合成方法に用いる反応液は、pHが $6.0 \sim 8.0$ に調製されたものであるのが好ましく、 $6.5 \sim 7.5$ に調製されたものであるのがより好ましい（従来の一般的な無細胞系タンパク質合成用の反応液のpH： $7.4 \sim 7.6$ ）。反応液のpHが $6.0$ 未満であると、タンパク質合成に必要な成分が変性する虞があるためであり、またpHが $8.0$ を越えると、タンパク質合成に必要な成分に好適なpHではないことにより、反応速度が遅くなる傾向があるためである。  
10

## 【0037】

通常、上記反応液としては、上記抽出液を除く成分として、カリウム塩、マグネシウム塩、DTT、アデノシン三リン酸、グアノシン三リン酸、クレアチニンリン酸、クレアチニナーゼ、アミノ酸成分、RNaseインヒビター、tRNA、mRNA、緩衝剤を少なくとも含有するのものを用いる。これにより、短時間で大量のタンパク質の合成が可能であるというような利点をさらに有する無細胞系タンパク質合成用の反応液を実現できる。

## 【0038】

当該反応液中におけるカリウム塩としては、抽出用液の成分として上述した各種のカリウム塩、好適には酢酸カリウム、を好ましく使用できる。カリウム塩は、上述した抽出用液におけるカリウム塩の場合と同様の観点から、当該反応液中において、 $10\text{ mM} \sim 500\text{ mM}$ 含有されることが好ましく、 $20\text{ mM} \sim 300\text{ mM}$ 含有されることがより好ましい。  
20

## 【0039】

当該反応液中におけるマグネシウム塩としては、抽出用液の成分として上述した各種のマグネシウム塩、好適には酢酸マグネシウム、を好ましく使用できる。マグネシウム塩は、上述した抽出液におけるマグネシウム塩の場合と同様の観点から、当該反応液中において、 $0.1\text{ mM} \sim 10\text{ mM}$ 含有されることが好ましく、 $0.5\text{ mM} \sim 5\text{ mM}$ 含有されることがより好ましい。

## 【0040】

当該反応液中におけるDTTは、上述した抽出用液におけるDTTの場合と同様の観点から、 $0.01\text{ mM} \sim 10\text{ mM}$ 含有されることが好ましく、 $0.1\text{ mM} \sim 5\text{ mM}$ 含有されることがより好ましい。  
30

## 【0041】

当該反応液中におけるアデノシン三リン酸（以下、「ATP」ということがある。）は、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において $0.01\text{ mM} \sim 2\text{ mM}$ 含有されることが好ましく、 $0.1\text{ mM} \sim 1\text{ mM}$ 含有されることがより好ましい。ATPが $0.01\text{ mM}$ 未満または $2\text{ mM}$ を越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

## 【0042】

当該反応液中におけるグアノシン三リン酸（以下、「GTP」ということがある。）は、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において $0.01\text{ mM} \sim 10\text{ mM}$ 含有されることが好ましく、 $0.2\text{ mM} \sim 5\text{ mM}$ 含有されることがより好ましい。GTPが $0.01\text{ mM}$ 未満または $10\text{ mM}$ を越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。  
40

## 【0043】

当該反応液中におけるクレアチニンリン酸は、タンパク質を継続的に合成するための成分であって、ATPとGTPを再生する目的で配合される。クレアチニンリン酸は、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において $10\text{ mM} \sim 50\text{ mM}$ 含有されることが好ましく、 $15\text{ mM} \sim 35\text{ mM}$ 含有されることがより好ましい。クレアチニンリン酸が $10\text{ mM}$   
50

未満であると、充分な量のATPとGTPが再生されにくく、結果としてタンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためであり、またクレアチニン酸が50mMを越えると、阻害物質として働き、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

#### 【0044】

当該反応液中におけるクレアチニナーゼは、タンパク質を継続的に合成するための成分であって、クレアチニン酸と共にATPとGTPを再生する目的で配合される。クレアチニナーゼは、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることが好ましく、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることがより好ましい。クレアチニナーゼが $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満であると、充分な量のATPとGTPが再生されにくく、結果としてタンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためであり、またクレアチニナーゼが $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ を越えると、阻害物質として働き、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。10

#### 【0045】

当該反応液中におけるアミノ酸成分は、20種類のアミノ酸、すなわち、バリン、メチオニン、グルタミン酸、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、グリシン、プロリン、イソロイシン、トリプトファン、アスパラギン、セリン、トレオニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、チロシン、リシン、グルタミン、シスチン、アルギニン、の20種類のアミノ酸を全て含有する。当該アミノ酸成分は、通常、上記20種類のアミノ酸を概ね等量ずつ含有してなる。

本発明においては、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において上記のアミノ酸成分が $1\mu\text{M}$ ～ $1000\mu\text{M}$ 含有されることが好ましく、 $10\mu\text{M}$ ～ $500\mu\text{M}$ 含有されることがより好ましい。アミノ酸成分が $1\mu\text{M}$ 未満または $1000\mu\text{M}$ を越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。20

#### 【0046】

当該反応液中におけるRNaseインヒビターは、抽出液に混在する酵母菌体由来のRNaseによって、本発明の無細胞系タンパク質合成の際にmRNAやtRNAが不所望に消化されて、タンパク質の合成を妨げるのを防ぐ目的で配合されるものであり、当該反応液中において $0.1\text{U}/\mu\text{L}$ ～ $20\text{U}/\mu\text{L}$ 含有されることが好ましく、 $0.2\text{U}/\mu\text{L}$ ～ $10\text{U}/\mu\text{L}$ 含有されることがより好ましい。RNaseインヒビターが $0.1\text{U}/\mu\text{L}$ 未満であると、RNaseの分解活性を充分抑えることができない傾向にあるためであり、またRNaseインヒビターが $20\text{U}/\mu\text{L}$ を越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。30

#### 【0047】

当該反応液中におけるmRNAにおいては、コードするタンパク質（ペプチドを含む）に特に制限はなく、毒性を有するタンパク質をコードするものであってもよいし、また糖タンパク質をコードするものであってもよい。なお用いるmRNAは、塩基数に特に制限はなく、目的とするタンパク質を合成し得るならばmRNA全てが同じ塩基数でなくともよい。また、目的とするタンパク質を合成し得る程度に相同な配列であれば、各mRNAは、複数個の塩基が欠失、置換、挿入または付加されたものであってよい。

本発明に用いるmRNAは、市販のものを適宜用いればよいが、pTNT Vector（プロメガ社製）由来の5'−βグロビンリーダー配列の下流に目的タンパク質をコードするDNAの開始コドンが挿入されたベクターを用いて転写反応で得られたmRNAを用いると、無細胞系での翻訳反応の効率が向上し、結果としてより多くの目的タンパク質を得ることができるため、好ましい。40

#### 【0048】

当該反応液中において、mRNAは、タンパク質合成の速度の観点から、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることが好ましく、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ～ $500\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることがより好ましい。mRNAが $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満または $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ を超えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

#### 【0049】

当該反応液中における tRNA は、上記 20 種類のアミノ酸に対応した種類の tRNA を概ね等量ずつ含有してなる。本発明においては、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において  $1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  含有されることが好ましく、 $10 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 500 \mu\text{g}/\text{mL}$  含有されることがより好ましい。 $t\text{RNA}$  が  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  未満または  $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  を越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

#### 【0050】

反応液に含有される緩衝剤としては、上述した本発明の抽出液と同様のものが好適に使用でき、同様の理由から、HEPES-KOH (pH 6 ~ 8) を使用するのが好ましい。また、緩衝剤は、上述した抽出液における緩衝剤の場合と同様の観点から、 $5 \text{mM} \sim 200 \text{mM}$  含有されることが好ましく、 $10 \text{mM} \sim 100 \text{mM}$  含有されることがより好ましい。

10

#### 【0051】

また上記反応液は、グリセロールを含有するのがより好ましい。グリセロールを添加すると、タンパク質合成反応においてタンパク質合成に必須な成分を安定化できるというような利点があるためである。グリセロールを添加する場合、通常、 $5 (\nu/\nu)\% \sim 20 (\nu/\nu)\%$  となるように添加する。

#### 【0052】

すなわち、本発明の無細胞系タンパク質合成方法に用いる反応液は、上記抽出液を  $10 (\nu/\nu)\% \sim 90 (\nu/\nu)\%$  含有するとともに、 $10 \text{mM} \sim 500 \text{mM}$  の酢酸カリウム、 $0.1 \text{mM} \sim 10 \text{mM}$  の酢酸マグネシウム、 $0.01 \text{mM} \sim 10 \text{mM}$  のDTT、 $5 (\nu/\nu)\% \sim 20 (\nu/\nu)\%$  のグリセロール、 $0.01 \text{mM} \sim 2 \text{mM}$  のATP、 $0.01 \text{mM} \sim 10 \text{mM}$  のGTP、 $10 \text{mM} \sim 50 \text{mM}$  のクレアチニンリン酸、 $1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$  のクレアチニキナーゼ、 $1 \mu\text{M} \sim 1000 \mu\text{M}$  のアミノ酸成分、 $0.1 \text{U}/\mu\text{L} \sim 20 \text{U}/\mu\text{L}$  のRNaseインヒビター、 $1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  のtRNA、 $1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  のmRNA、 $5 \text{mM} \sim 200 \text{mM}$  のHEPES-KOH (pH 6 ~ 8) を含有するように実現されるのが好ましい。

20

#### 【0053】

本発明の無細胞系タンパク質合成方法は、上記のような本発明の抽出液を用いて、従来公知のたとえば低温恒温槽にて行う。反応に際しては、通常、上記抽出液を含有する反応液を調製して、これを用いて行う。

30

#### 【0054】

また反応温度は、通常、 $10^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ 、好ましくは $15^\circ\text{C} \sim 35^\circ\text{C}$ の範囲内である。反応温度が $10^\circ\text{C}$ 未満であると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあり、また反応温度が $40^\circ\text{C}$ を越えると、必須な成分が変性する傾向にあるためである。

#### 【0055】

また、本発明の無細胞系タンパク質合成方法においては、酵母抽出液を透析しながらタンパク質の合成反応を行うことが好ましい。このように透析を行なながらタンパク質の合成を行うことで、ATPなどのタンパク質合成に必要なエネルギー源が透析外液から常に供給されるため、タンパク質合成反応時間が延長するというような利点がある。

40

酵母抽出液を透析しながらタンパク質の合成を行う場合、具体的には、透析膜に収容した反応液を、透析外液を収容した反応槽内に浸して、タンパク質合成反応を行う。

#### 【0056】

用いる透析膜は特に制限されず、従来公知の種々のものを用いればよいが、分子量 3,000 以下、特には分子量 10,000 以下の物質を反応液から透析外液に拡散し得るものであるのが好ましい。このような透析膜としては、たとえば、Slide-A-Lyzer (PIERCE 社製、排除分子量 : 10,000) などが例示される。

また用いる透析外液としては、上記透析がなされる組成であれば特に制限されるものではない。たとえば、反応液の組成より抽出液、tRNA、mRNA、クレアチニキナーゼ、RNaseインヒビターを除いたような組成の透析外液を使用することができる。

#### 【0057】

50

本発明の無細胞系タンパク質合成方法にて合成されたタンパク質の量は、酵素の活性の測定、SDS-PAGE、免疫検定法などによって測定できる。

【0058】

本発明の無細胞系のタンパク質合成方法にて合成できるタンパク質に特に制限はない。

【0059】

【実施例】

以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。

参考例1

:酵母 (Schizosaccharomyces pombe) 菌体の培養

10

Schizosaccharomyces pombeをYEPD培地 (Glucose: 1.0%, yeast extract: 1.0%, polypepton: 2.0%) 6 mLを含む太口試験管に植菌し、30℃、16時間振盪培養した。これを前培養液とし、0.5 μMチアミンを含むYEPD培地 2.5 Lに10 mL植菌し、30℃、約15時間、660 nmの吸光度が1.0になるまで通気搅拌培養した。培養液を遠心分離 (4℃、8,000×g、5分間) し、菌体を回収した。その結果、2.5 Lの培養液より約6 gの湿菌体が得られた。

【0060】

実施例1

20

:無細胞系タンパク質合成用酵母抽出液の調製

上記参考例1で得られた酵母菌体を滅菌水で洗浄後、遠心分離 (4℃、8,000×g、5分間) により再度菌体を回収した。菌体湿重量 1 g に対して 3 mL の下記組成の抽出用液で洗浄した。

〔抽出用液の組成〕

|          |                    |
|----------|--------------------|
| · 50 mM  | HEPES-KOH (pH 7.0) |
| · 100 mM | 酢酸カリウム             |
| · 2 mM   | 酢酸マグネシウム           |
| · 2 mM   | DTT                |

再度遠心分離 (4℃、8,000×g、5分間) により菌体を回収した。回収した菌体約5 g を-80℃で凍結させた乳鉢に移した。これに液体窒素を添加し、乳鉢内で乳棒を用いて激しくすり潰した。すり潰した菌体に、0.5 mM PMSFを含む抽出用液4.5 mLを加え抽出した。抽出後、遠心分離 (4℃、30,000×g、10分間) により、菌体残渣を除去し、得られた上清を再度遠心分離 (4℃、30,000×g、30分間) した。遠心後の上清 2.0 mLを20(v/v)%グリセロールを含む抽出用液で平衡化したPD-10 (アマシャムバイオサイエンス社製) にアプライし、同抽出用液で溶出した。分画は50.0 μLずつ行った。各画分の280 nmおよび260 nmの吸光度を測定し、それぞれ20および30以上の画分を集め、これを酵母由来の無細胞タンパク質合成用抽出液とした。この操作によって280 nmと260 nmの吸光度がそれぞれ25と42の抽出液を約1.5 mL得ることができた。

30

【0061】

比較例1

40

:ガラスピーズ法による酵母抽出液の作製

上記参考例1で得られた酵母菌体を滅菌水で洗浄後、遠心分離 (4℃、8,000×g、5分間) により再度菌体を回収した。菌体湿重量 1 g に対して 3 mL の下記組成の抽出用液で洗浄した。

〔抽出用液の組成〕

|          |                    |
|----------|--------------------|
| · 50 mM  | HEPES-KOH (pH 7.0) |
| · 100 mM | 酢酸カリウム             |
| · 2 mM   | 酢酸マグネシウム           |
| · 2 mM   | DTT                |

50

再度遠心分離（4℃、8,000×g、5分間）により菌体を回収した。回収した菌体5gを0.5mM PMSFを含む抽出用液5mLに懸濁した後、10gのガラスビーズを加えた。これをマルチビーズショッカー（安井器械株式会社製）を用いて、2,500r p m、30秒、10サイクルの条件で酵母菌体の破碎を行った。菌体を破碎後、遠心分離（4℃、8,000×g、5分間）により菌体残渣を除去し、得られた上清を遠心分離（4℃、30,000×g、10分間）し、得られた上清を再度遠心分離（4℃、30,000×g、30分間）した。得られた上清2.0mLを20%グリセロールを含む抽出用液で平衡化したPD-10にアプライし、同抽出用液で溶出した。分画は500μLずつ行った。各画分の280nmおよび260nmの吸光度を測定し、それぞれ90、150以上の画分を集め、これを酵母由来の無細胞系タンパク質合成用の抽出液とした。この操作によって、280nmと260nmの吸光度が、110、180の抽出液を約1.5mL得ることができた。  
10

### 【0062】

#### 実験例1

：実施例1、比較例1で得られた抽出液を用いた無細胞系でのタンパク質合成

上記実施例1および比較例1で得られた抽出液を用いて、下記に示す組成の反応液を調製した。

#### 〔反応液の組成〕

|               |                     |
|---------------|---------------------|
| · 5.0 (v/v) % | 酵母抽出液               |
| · 2.5 mM      | HEPES-KOH (pH 7.0)  |
| · 5.0 mM      | 酢酸カリウム              |
| · 2 mM        | 酢酸マグネシウム            |
| · 1 mM        | DTT                 |
| · 1.0 (v/v) % | グリセロール              |
| · 0.5 mM      | ATP                 |
| · 0.1 mM      | GTP                 |
| · 2.5 mM      | クレアチニン酸             |
| · 2.00 μg/mL  | クレアチンキナーゼ           |
| · 4.0 μM      | アミノ酸（20種）           |
| · 1 U/μL      | RNaseインヒビター（ヒト胎盤由来） |
| · 2.00 μg/mL  | tRNA (yeast由来)      |
| · 2.0 μg/mL   | mRNA                |

20

30

40

mRNAとしては、ルシフェラーゼをコードするmRNA（ルシフェラーゼコントロールRNA、プロメガ社製）を用いた。また、反応装置として低温アルミブロック恒温槽MG-1000（東京理化器械社製）を用い、無細胞系タンパク質の合成反応を行った。反応温度は30℃で行い、反応液量は2.5μLとした。合成されたルシフェラーゼの定量は、ルシフェラーゼアッセイキット（E-1500、プロメガ社製）を用いて行った。ルシフェラーゼアッセイ試薬5.0μLに反応液2.5μLを添加し、ルミノメータ（turner Designs TD-20/20、プロメガ社製）を用いて、ルシフェラーゼによる発光を測定した。

図1は、実施例1および比較例1の酵母抽出液を用いた各反応時間におけるルシフェラーゼの合成量を示すグラフである。図1において縦軸はルシフェラーゼ合成量（ng/mL）、横軸は反応時間（min）を示す。図1において、凍結破碎法で調製した酵母抽出液を用いたタンパク質合成反応は反応開始後3時間まで継続し、60ng/mLのルシフェラーゼが合成された。それと比較してガラスビーズ法で調製した酵母抽出液では、合成反応は1時間で停止し、ルシフェラーゼ合成量は14ng/mLであった。

### 【0063】

#### 実験例2

：濃縮抽出液を用いた無細胞系タンパク質合成

上記実施例1で作製した抽出液をultrafree-0.5 centrifugal 50

filter & tube (millipore社製、排除分子量：10,000)によって、段階的に濃縮し、抽出液の280nmの吸光度が22、37、50、62、74である濃縮抽出液をそれぞれ調製した。濃縮した各抽出液を用いて、上記実験例1と同様の組成の反応液を調製し、実験例1と同様に無細胞タンパク質合成および合成されたルシフェラーゼの定量を行った。

図2は、濃縮抽出液を用いた合成反応開始3時間後のルシフェラーゼの合成量を示すグラフである。図2において縦軸はルシフェラーゼ合成量 (ng/mL)、横軸は抽出液の280nmの吸光度を示す。図2に示すように、抽出液の280nmの吸光度を35~50に濃縮した抽出液が最も合成量が高く約100ng/mLのルシフェラーゼが合成された。

10

### 【0064】

#### 参考例2

##### : mRNAの作製

###### (1) ベクターDNAの構築

pGEM-luc Vector (プロメガ社製) 5ngを鋳型とし、配列表配列番号1に示す塩基配列を有するプライマー (Luc T7-F3-Kpn) と、配列表配列番号2に示す塩基配列を有するプライマー (Luc T7-R4-Kpn) と、KOD plus (東洋紡績社製) を用いて、97°C 15秒、55°C 30秒、68°C 120秒、30サイクルのPCRを行った。エタノール沈殿によりDNA断片を精製した後、KpnIで消化した。

20

これとは別に、pTNT Vector (プロメガ社製) をKpnIで消化した。これらの反応液をアガロースゲル電気泳動で分離した後、Gen Elute Gel Purification Kit (シグマ社製) を用いてDNA断片を精製した。

Ligation High (東洋紡績社製) を用いて、上記pGEM-luc Vector由来のDNA断片と、上記pTNT Vector由来のDNA断片とをライゲーションした後、大腸菌DH5 $\alpha$  (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換した大腸菌からアルカリ-SDS法によりプラスミドを調製したプラスミドDNAを、配列表配列番号3に示す塩基配列を有するプライマー (T7 promoter) およびBig Dye Terminator Cycle Sequencing FS (アプライドバイオシステムズ社製) を用いてシークエンシング反応 (96°C 10秒、50°C 5秒、60°C 4分、30サイクル) を行った。この反応液をABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ社製) に供し、塩基配列解析を行った。pTNT Vector由来の5'- $\beta$ グロビンリーダー配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子の開始コドンが挿入されたプラスミドをpTNT-Lucと命名した。

30

### 【0065】

###### (2) in vitro 転写反応

上記(1)で作製したpTNT-LucをBamHIで消化した後、エタノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。これを鋳型とし、in vitro 転写反応を行った。転写反応液としては、以下の組成のものを用いた。

40

###### [転写反応液の組成]

|                 |                           |
|-----------------|---------------------------|
| · 80 mM         | HEPES-KOH (pH 7.4)        |
| · 24 mM         | 酢酸マグネシウム                  |
| · 40 mM         | DTT                       |
| · 7.5 mM        | NTPs (ATP, GTP, UTP, CTP) |
| · 2 mM          | スペルミジン                    |
| · 1 U/ $\mu$ L  | RNaseインヒビター (ヒト胎盤由来)      |
| · 1 U/ $\mu$ L  | T7 RNAポリメラーゼ              |
| · 50 $\mu$ g/mL | pTNT-Luc/BamHI            |

NTPs (シグマ社製)、RNaseインヒビター (宝酒造社製)、T7 RNAポリメラーゼ (プロメガ社製) をそれぞれ用いた。反応装置として低温アルミブロック恒温槽

50

MG-1000 (東京理化器械社製) を用いた。転写反応は37℃、4時間で行い、反応液量は20μLとした。

#### 【0066】

##### (3) mRNAの精製

転写反応終了後、上記(2)の反応液20μLに1UのRNase-free DNase(プロメガ社製)を添加し、37℃、15分間インキュベートし、錆型DNAを消化した。エノールクロロホルム抽出によりタンパク質を除去した後、酢酸カリウムを終濃度0.3Mとなるように添加し、エタノール沈殿を行った。得られた沈殿を100μLの滅菌水に溶解し、Nick Column(アマシャムバイオサイエンス社製)にアプライした。滅菌水400μLで溶出を行った。溶出画分を回収し、酢酸カリウムを終濃度0.3Mとなるように添加し、エタノール沈殿を行った。合成されたmRNAの定量は、260nmの吸光度を測定して行った。その結果、20μLスケールの反応で約60μgのmRNAが合成された。

#### 【0067】

##### 実験例3

###### :参考例2で得られたmRNAを用いた無細胞系タンパク質合成

上記参考例2で得られたmRNAを錆型として用い、また抽出液として実施例1で作製した抽出液を280nmの吸光度が35になるよう濃縮したものを用いた以外は、実験例1と同様の組成の反応液を調製し、無細胞系タンパク質合成反応および合成されたルシフェラーゼの定量を行った。

結果、合成反応3時間後のルシフェラーゼ合成量は、コントロールmRNA(プロメガ社製)を錆型にした場合89ng/mLであったのに対し、218ng/mLであり、コントロールmRNAの約2.5倍の合成量が得られた。

#### 【0068】

##### 実験例4

###### :無細胞系タンパク質合成における各成分添加量の影響

実施例1と同様の方法で作製した抽出液を280nmの吸光度が35になるよう濃縮したサンプルを用いて、無細胞系タンパク質合成反応における各成分添加量の影響を調べた。その結果得られた最適な反応液組成は、以下のとおりであった。

###### [反応液の組成]

|               |                     |
|---------------|---------------------|
| · 5.0 (v/v) % | 酵母抽出液               |
| · 2.5 mM      | HEPES-KOH (pH 7.0)  |
| · 5.0 mM      | 酢酸カリウム              |
| · 2 mM        | 酢酸マグネシウム            |
| · 1 mM        | DTT                 |
| · 1.0 (v/v) % | グリセロール              |
| · 0.5 mM      | ATP                 |
| · 0.1 mM      | GTP                 |
| · 2.5 mM      | クレアチニンリン酸           |
| · 2.00 μg/mL  | クレアチニナーゼ            |
| · 4.0 μM      | アミノ酸(20種)           |
| · 1 U/μL      | RNAseインヒビター(ヒト胎盤由来) |
| · 2.00 μg/mL  | tRNA(yeast由来)       |
| · 2.0 μg/mL   | mRNA                |

このような最適組成の反応液を用い、実験例1と同様にルシフェラーゼ合成反応および定量を行った。その結果、合成反応開始後3時間で580ng/mLのルシフェラーゼが合成された。

#### 【0069】

##### 実験例5

###### :透析法による無細胞系のタンパク質合成

10

20

30

40

50

実施例1と同様の方法で作製した抽出液を280 nmの吸光度が35になるように濃縮したサンプルを用い、上記実験例4の組成の反応液を調製して、透析法による無細胞系タンパク質合成を行った。透析膜としては、S i d e - A - L y z e r (排除分子量: 10,000, PIERCE社製) を使用し、透析外液としては下記組成のものを1.1mL用いた。

【透析外液の組成】

|              |                            |
|--------------|----------------------------|
| • 25 mM      | H E P E S - K O H (pH 7.0) |
| • 5 mM       | 酢酸カリウム                     |
| • 2 mM       | 酢酸マグネシウム                   |
| • 1 mM       | D T T                      |
| • 10 (v/v) % | グリセロール                     |
| • 0.5 mM     | A T P                      |
| • 0.1 mM     | G T P                      |
| • 25 mM      | クレアチニン酸                    |
| • 40 μM      | アミノ酸 (20種)                 |

10

無細胞系タンパク質合成反応および合成されたルシフェラーゼの定量は実験例1と同様にして行った。

図3は、透析法およびバッチ法(実験例4での結果)による無細胞系タンパク質合成反応での、反応時間に対するルシフェラーゼの合成量の比較を示すグラフである。図3において、縦軸はルシフェラーゼ合成量(μg/mL)を示し、横軸は反応時間(min)を示す。図3に示すように、透析法により当該透析を行わない場合の合成量の約1.7倍である1.0 μg/mLのルシフェラーゼが合成された。

20

【0070】

【発明の効果】

以上の説明で明らかなように、本発明によれば、調製が容易であり、かつ従来よりもタンパク質合成量の高い無細胞系タンパク質合成用抽出液の調製方法、および該抽出液、ならびにこの抽出液を用いた無細胞系のタンパク質合成方法を提供することができる。

【0071】

【配列表のフリーテキスト】

30

配列番号1:

プライマー Luc T7-F3-Kpn

配列番号2:

プライマー Luc T7-R4-Kpn

配列番号3:

プライマー T7 promoter

【0072】

【配列表】

**SEQUENCE LISTING**

**<110> RENGO CO, LTD.**

**<120> yeast extract for the cell-free synthesis of protein**

**<130> A5834**

10

**<160> 3**

**<210> 1**

**<211> 30**

**<212> DNA**

**<213> Artificial Sequence**

20

**<220>**

**<223> Luc T7-F3-Kpn**

〈400〉 1

gggttaccat ggaagacgcc aaaaacataa 30

〈210〉 2

〈211〉 29

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

10

〈220〉

〈223〉 Luc T7-R4-Kpn

〈400〉 2

gggttacctt acaatttggc cttccggc 29

20

〈210〉 3

〈211〉 20

〈212〉 DNA

〈213〉 Artificial Sequence

〈220〉

〈223〉 T7 promoter

30

〈400〉 3

taatacgact cactataggc 20

#### 【図面の簡単な説明】

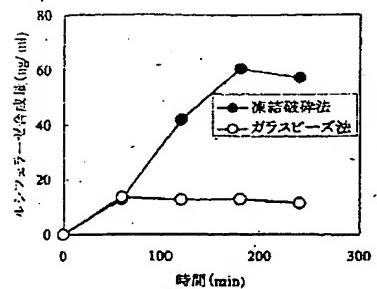
【図1】実施例1および比較例1の酵母抽出液を用いた各反応時間におけるルシフェラーゼの合成量を示すグラフであり、縦軸はルシフェラーゼ合成量（ng/mL）、横軸は反応時間（min）を示す。

40

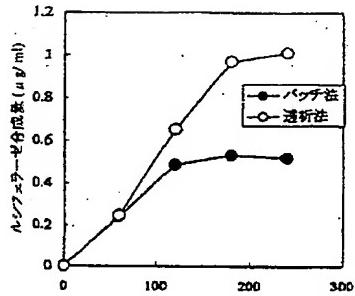
【図2】濃縮抽出液を用いた合成反応開始3時間後のルシフェラーゼの合成量を示すグラフであり、縦軸はルシフェラーゼ合成量（ng/mL）、横軸は抽出液の280nmの吸光度を示す。

【図3】透析法およびバッチ法による無細胞系タンパク質合成反応での、反応時間に対するルシフェラーゼの合成量の比較を示すグラフである。

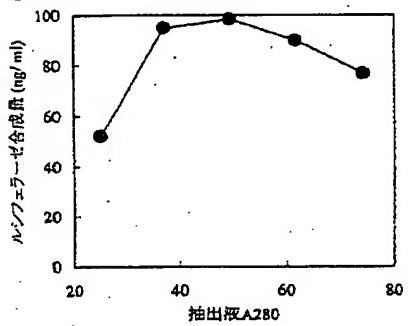
【図 1】



【図 3】



【図 2】



---

フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA20 BA08 CA01 CA12  
4B050 CC08 DD04 KK20 LL05  
4B064 AG01 CA19 CC24 CD30 DA16

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**